

Brevet N°

86 6 5 5

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG

du 10 novembre 1986

Titre délivré 13 JUIN 1988



Monsieur le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes
Service de la Propriété Intellectuelle
LUXEMBOURG

10.5.88
aj. 18m.

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La soc.dite PROGEN BIOTECHNIK GmbH, Im Neuenheimer Feld 519,
D - 6900 Heidelberg

représentée par E.Meyers & E.T.Freylinger, Ing.conseils en propr.ind.,
46 rue du Cimetière, Luxembourg, agissant en qualité de mandataires

dépose(nt) ce dix novembre mil neuf cent quatre vingt six

à 10⁰⁰ heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg:

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant:

"Verfahren zur Identifizierung von Metastasen"

2. la description en langue allemande de l'invention en trois exemplaires;

3. planches de dessin, en trois exemplaires;

4. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg, le 10 novembre 1986;

5. la délégation de pouvoir, datée de Heidelberg le 05 novembre 1986;

6. le document d'ayant cause (autorisation);

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont):

1. - Dr Gerda BRUDER, Bergheimer Strasse 110A, D - 6900 Heidelberg

2. - Prof. Dr Werner Wilhelm FRANKE, Landfriedstrasse 6, D - 6900 Heidelberg

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de

déposée(s) en

le (9)

sous le N° (10)

au nom de (11)

élit(élisent) domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg

46 rue du Cimetière, Luxembourg

solicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées,

avec ajournement de cette délivrance à dix-huit

mois.

Le déposant/mandataire Ernest Meyers

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes,
Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du: 10 novembre 1986

à 10⁰⁰ heures



Pr. le Ministre de l'Économie et des Classes Moyennes,

Le chef du service de la propriété intellectuelle,

A 68007

EXPLICATIONS RELATIVES AU FORMULAIRE DE DÉPÔT.

(1) s'il y a lieu "Demande de certificat d'addition au brevet principal, à la demande de brevet principal No. du" - (2) inscrire les nom, prénom, profession, adresse du demandeur, lorsque celui-ci est un particulier ou les dénomination sociale, forme juridique, adresse du siège social, lorsque le demandeur est une personne morale - (3) inscrire les nom, prénom, adresse du mandataire agréé, conseil en propriété industrielle, muni d'un pouvoir spécial, s'il y a lieu: "représenté par agissant en qualité de mandataire" - (4) date de dépôt en toutes lettres - (5) titre de l'invention - (6) inscrire les noms, prénoms, adresses des inventeurs ou l'indication "(voir) désignation séparée (suivra)", lorsque la désignation se fait ou se fera dans un document séparé, ou encore l'indication "ne pas mentionner", lorsque l'inventeur signe ou signera un document de non-mention à joindre à une désignation ou, le cas échéant, - (7) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité, brevet européen (CBE), protection internationale (PCT) - (8) Etat dans lequel le premier dépôt a été effectué ou, le cas échéant, États désignés dans la demande européenne ou internationale prioritaire - (9) date du premier dépôt - (10) numéro du premier dépôt complété, le cas échéant, par l'indication de l'office récepteur CBE/PCT - (11) nom du titulaire du premier dépôt - (12) adresse du domicile effectif ou élu au Grand-Duché de Luxembourg - (13) 2. 6. 12 ou 18 mois - (14) signature du demandeur ou du mandataire agréé.

Brevet N°

86655

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG

du 10 novembre 1986

Titre délivré



Monsieur le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes
Service de la Propriété Intellectuelle
LUXEMBOURG

10.5.88
aj. 18 m.

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La soc.dite PROGEN BIOTECHNIK GmbH, Im Neuenheimer Feld 519,
D - 6900 Heidelberg

représentée par E.Meyers & E.T.Freylinger, Ing.conseils en propr.ind.,
46 rue du Cimetière, Luxembourg, agissant en qualité de mandataires

dépose(nt) ce dix novembre mil neuf cent quatre vingt six

à 10⁰⁰ heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg:

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant:

"Verfahren zur Identifizierung von Metastasen"

2. la description en langue allemande de l'invention en trois exemplaires;

3. -- planches de dessin, en trois exemplaires;

4. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg, le 10 novembre 1986 ;

5. la délégation de pouvoir, datée de Heidelberg le 05 novembre 1986 ;

6. le document d'ayant cause (autorisation);

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont):

1. - Dr Gerda BRUDER, Bergheimer Strasse 110A, D - 6900 Heidelberg

2. - Prof. Dr Werner Wilhelm FRANKE, Landfriedstrasse 6, D - 6900 Heidelberg

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de

-- déposée(s) en (8) --

le (9) --

sous le N° (10) --

au nom de (11) --

élit(é lisent) domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg

46 rue du Cimetière, Luxembourg

solicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées,

avec ajournement de cette délivrance à dix-huit mois.

Le dépositaire/mandataire Ernest Meyers

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes,
Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du: 10 novembre 1986

à 10⁰⁰ heures



Pr. le Ministre de l'Économie et des Classes Moyennes,

p. d.

Le chef du service de la propriété intellectuelle,

A 68007

EXPLICATIONS RELATIVES AU FORMULAIRE DE DÉPÔT.

(1) s'il y a lieu "Demande de certificat d'addition au brevet principal, à la demande de brevet principal No ... du ...". (2) inscrire les nom, prénom, profession, adresse du demandeur, lorsque celui-ci est un particulier ou les dénomination sociale, forme juridique, adresse du siège social, lorsque le demandeur est une personne morale - (3) inscrire les nom, prénom, adresse du mandataire agréé, conseil en propriété industrielle, muni d'un pouvoir spécial, s'il y a lieu: "représenté par ... agissant en qualité de mandataire" - (4) date de dépôt en toutes lettres - (5) titre de l'invention - (6) inscrire les noms, prénoms, adresses des inventeurs ou l'indication "(voir) désignation séparée (suivra)". lorsque la désignation se fait ou se fera dans un document séparé, ou encore l'indication "ne pas mentionner", lorsque l'inventeur signe un document de non-mention à joindre à une désignation séparée présente ou future - (7) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité, brevet européen (CBE), protection internationale (PCT) - (8) Etat dans lequel le premier dépôt a été effectué ou, le cas échéant, Etats désignés dans la demande européenne ou internationale prioritaire - (9) date du premier dépôt - (10) numéro du premier dépôt complété, le cas échéant, par l'indication de l'office récepteur (CBE/PCT) - (11) nom du titulaire du premier dépôt - (12) nom du titulaire du premier dépôt complété, le cas échéant, par l'indication de l'office récepteur (CBE/PCT).

P A T E N T A N M E L D U N G

Verfahren zur Identifizierung von Metastasen

PROGEN BIOTECHNIK GmbH
Im Neuenheimer Feld 519
D - 6900 Heidelberg

VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON METASTASEN

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erkennung von Metastasen einer ersten Gewebeklasse, die in einem Wirtsgewebe einer zweiten Gewebeklasse angesiedelt sind, bei dem Intermediärfilamentproteine aus dem Gesamtgewebe mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden.

Es ist bekannt, mit spezifischen Antikörpern histodiagnostisch Intermediärfilamentproteine zu identifizieren. Intermediärfilamentproteine sind Bestandteile des Cytoskeletts und jeweils typisch für eine Gewebeklasse. Eine solche Identifizierung ermöglicht es, Intermediärfilamentproteine von Metastasen dem Ursprungsgewebe beziehungsweise dem Primärtumor zuzuordnen.

Die Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß aus dem Gesamtgewebe ein Homogenat gebildet wird, daß auf das Homogenat abbauend eingewirkt wird, bis aus wenigstens einem großen Teil der Intermediärfilamentproteine jeweils ein Fragment, welches das alpha-helikale Mittelstück enthält, freigesetzt ist, daß dann die lösliche Fraktion abgetrennt wird und, daß dann die in der löslichen Fraktion enthaltenen alpha-helikalen Mittelstücke in löslicher Phase identifiziert werden.

Intermediärfilamentproteine (IF) bestehen aus tetrameren (jeweils 2 Homo- bzw. Heterodimere) Untereinheiten mit einem alpha-helikalen Mittelstück und beidseitig am Mittelstück hängenden unterschiedlich langen Endstücken. Im alpha-helikalen Mittelstück finden sich hinreichende Charakteristika für die Zuordnung eines IF-Proteins zum Gewebe. Die Mittelstücke sind relativ stabil, so daß ein Abbau zunächst an den Endstücken angreift und das Mittelstück zunächst in-

takt läßt. Die Mittelstücke allein sind hinreichend löslich.

Nach der Erfindung werden zunächst die unterschiedlichen langen Endstücke abgebaut und die Mittelstücke intakt gelassen. Diese Mittelstücke können dann in der löslichen Phase nachgewiesen werden. Dazu geeignete Antikörper können mit bekannten Verfahren gewonnen werden, weshalb das hier nicht weiter abgehandelt wird.

Aufgabe einer Weiterbildung ist es, über das Ausmaß der Metastasierung eine Aussage zu machen. Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß von den IF-Proteinen beider Gewebetypen des Homogenats ein vorgegebener Anteil identifiziert und quantifiziert wird, und daß daraus der Anteil des Metastisengewebes am Wirtsgewebe ermittelt wird. Diese Lösung nutzt den Umstand aus, daß das immunologisch biochemische Verfahren eine quantifizierbare Aussage liefert im Gegensatz zu der bekannten Histodiagnose.

Es gibt verschiedene Cytokeratine (CK NR 1 - 19), deren Expressionsmuster die verschiedenen Epithelgeweben zugeordnet sind. Deshalb wird vorzugsweise bei Cytokeratinen die Art des jeweils zugeordneten Epithelgewebes anhand der relativen Anteile der identifizierten Cytokeratine bestimmt und quantifiziert. Auch für diese Zuordnung liegen hinreichende Charakteristika in den alpha-helikalen Mittelstücken vor.

Um sicherzustellen, daß die alpha-helikalen Mittelstücke beim Abbau nicht so weit mit zerstört werden, daß die Identifikation behindert wird, empfiehlt es sich, daß diese nur so weit abgebaut werden, bis sie zu 80 bis 100 Gewichtsprozent bei einer Temperatur von 0 - 40 Grad Celsius in physiologischer Kochstalllösung löslich sind. Das geschieht durch Abstoppen der Proteaseaktivität durch geeignete Inhibitoren.

Aus dem gleichen Grunde ist es zweckmäßig, die IF-Proteine nur so weit abzubauen, daß bei mindestens 80 Gewichtsprozent das alpha-helikale Mittelstück intakt bleibt.

Bevorzugt wird dieses Verfahren angewendet auf Lymphgewebe als Wirtsgewebe, da sich Metastasen im allgemeinen zunächst im Lymphgewebe ansiedeln. Die IF-Proteine dienen dann als "Marker" für das Ursprungsgewebe, das als Fremdgewebe, zum Beispiel als Mammagewebe, in einem Lymphknoten nachgewiesen wurde.

Der teilweise Abbau kann chemisch, zum Beispiel mit Säuren oder Basen erfolgen. Der teilweise Abbau kann auch physikalisch, zum Beispiel durch Erhitzung oder Bestrahlung erfolgen. Vorzugsweise erfolgt der teilweise Abbau jedoch proteolytisch, weil auf diese Weise bei den hier in Frage stehenden Proteinen der Abbau verhältnismäßig leicht genau so zu dosieren ist, daß die Mittelstücke einerseits löslich andererseits für die Identifizierung hinreichend intakt erhalten bleiben.

Die Erfindung wird nun anhand der beigefügten Beispiele näher erläutert.

BEISPIEL 1

Nachweis von Metastasen in Lymphgewebe

a) Es wird zunächst das Feuchtgewicht des Lymphknotengewebes ermittelt. Das Gewebe wird im dreifachen Volumen - bezogen auf das Feuchtgewicht - einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (10 mM (millimolar) Natriumphosphat pH 7,4, 150 mM Natriumchlorid) mit Hilfe eines Messerhomogenisators bis zur breiartigen Konsistenz zerkleinert (es wird der Einsatz eines Polytron-Homogenisators der Firma Kinematica, Luzern / Schweiz empfohlen). Dem Gewebebrei wird Chymotrypsin im Verhältnis 1:1000 (berechnet auf das Feuchtgewicht des Gewebes) zugesetzt. Es folgt ein Inkubationsschritt bei 30°C (Grad Celsius) (vorzugsweise im Thermoblock, eventuell im Wasserbad), der nach 60 Minuten abgestoppt wird. Das Abstoppen der Enzymaktivität geschieht durch Zusatz von 5 mM NCDC (2-Nitro-4-carboxyphenyl-N-N-diphenylcarbamate). Anschließend wird das Homogenat 30 Minuten bei 10⁴ g (g = Gravitationskonstante) zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen werden 80 bis 95 Gewichtsprozent der alpha-helikalen Mittelstücke in noch identifizierbarem Zustand aus den IF-Proteinen freigesetzt.

b) Ermittlung des Vimentingehaltes und Bestimmung des Vimentingehaltes

Im zentrifugierten Überstand wird Vimentin immunologisch durch einen Sandwich-ELISA bestimmt. Hierzu dient ein erster Antikörper GP-8, der sogenannte Fänger-Antikörper, der gegen ein erstes Epitop des alpha-helikalen Mittelstückes gerichtet ist, und ein zweiter monoklonaler Antikörper V-100, der sogenannte Detektor-Antikörper, der gegen ein zweites Epitop des alpha-helikalen Mittelstückes, das vom ersten Epitop unabhängig und verschieden ist, gerichtet ist. Der Antikörper V-100 ist mit Peroxidase gekoppelt und wird bei der Bindung

an das alpha-helikale Mittelstück über die Enzymaktivität der Peroxidase nachgewiesen. Zur Standardisierung wird bekanntes, gereinigtes alpha-helikales Vimentin-Fragment dem gleichen Sandwich-ELISA mit den gleichen Antikörpern unterworfen. Der so erhaltene Vimentinwert dient dann als Bezugsgröße für die quantitative Auswertung der Meßergebnisse.

c) Ermittlung der Cytokeratine und Bestimmung der Cytokeratingehalte

Im zentrifugierten Überstand werden die vorhandenen Cytokeratine immunologisch durch einen Sandwich-ELISA bestimmt. Hierzu dient ein erster monoklonaler Antikörper PAN-CI, der sogenannte Fänger-Antikörper, der gegen ein erstes Epitop aller Cytokeratine gerichtet ist. Es sind 19 monoklonale Antikörper C-401 bis C-419 vorgesehen, sogenannte Detektorantikörper, die einzeln spezifisch den einzelnen 19 bekannten Cytokeratinen zugeordnet sind. Die Detektorantikörper sind enzymatisch markiert wie die Detektorantikörper V-100. Der Nachweis und Standardisierung erfolgt entsprechend wie unter b) jedoch immer bezogen auf das spezielle der 19 möglichen Cytokeratine, so daß man den relativen Anteil der einzelnen Cytokeratine berechnen kann.

Wenn nur die Cytokeratine Nr. 5, Nr. 7, Nr. 8, Nr. 14, Nr. 17 und Nr. 19 mit hinreichendem Anteil und gegebenenfalls zusätzlich die Cytokeratine Nr. 15 und Nr. 18 nachgewiesen werden, dann läßt das auf eine Metastase eines Mamma-Tumors schließen.

BEISPIEL 2

Genauere Identifizierung einer Metastase für den Fall einer nach Beispiel 1 gefundenen Mammametastase

Im Falle, daß aufgrund der Untersuchung nach Beispiel 1 b) und c) im axillären Lymphknoten Mammametastasen nachgewiesen wurden, wird der Rezeptor-Gehalt für Östrogen und Progesteron im Homogenat aus Absatz a) Beispiel 1 bestimmt. Diese Rezeptor-Gehaltsbestimmung wird auf den nach Absatz c) Beispiel 1 gewonnenen Gehalt an alpha-helikalem Cytokeratin Fragmenten bezogen. Die gewonnene Bezugsgröße ist ein Maß für den Anteil derjenigen Metastasenzellen, die mit dem betreffenden Hormonrezeptor ausgestattet sind. Eine solche Bezugsgröße konnte bislang mit bekannten Mitteln nicht gewonnen werden; sie ist ein Maß für die zweckmäßig einzusetzende Chemotherapie.

BEISPIEL 3 und 4

Nachweis von Metastasen in Beckenkammbiopsien und Sternumpunktaten

Wie Beispiel 1 mit dem einzigen Unterschied, daß anstelle des Lymphknotengewebes im Beispiel 3 Beckenkammbiopsien und im Beispiel 4 Sternumpunktate eingesetzt wird.

BEISPIEL 5

Gewinnung der Antikörper gegen Vimentin

Vimentin wird aus Augenlinsen von Rindern gereinigt, als Filament rekonstituiert, mit Chymotrypsin gespalten und das alpha-helikale Mittelstück chromatographisch abgetrennt und eingesetzt zur Herstellung der monoklonalen Antikörper mit Hilfe der Hybridomtechnik. Die Spezifität der Antikörper wird mit Hilfe der gereinigten alpha-helikalen Fragmente

festgestellt und Kreuzreaktionen mit den übrigen IF-Proteinen durch Immunreaktionen in nativem (beziehungsweise renaturiertem) und denaturiertem Zustand dieser Proteine ausgeschlossen.

BEISPIEL 6

Gewinnung der Antikörper gegen Cytokeratine

Cytokeratin wird aus dem Cytoskelett von MCF-7 Kulturzellen (die Zelllinie leitet sich von einem humanen Mamma-Carcinom ab) gereinigt, die Cytokeratine Nr. 5 - 7 und 14 - 17 werden aus dem Cytoskelett von laktierendem Kuheuter gereinigt. Nach Rekonstitution je eines sauren (Nr. 1 - 8) und eines basischen (Nr. 9 - 19) Cytokeratin werden nach Protease-Behandlung gereinigte Fragmente zur Immunisierung und Gewinnung von monoklonalen Antikörpern eingesetzt wie für Vimentin beschrieben.

BEISPIEL 7 - 11

Wie Beispiel 1 - 4, wobei jedoch statt den einzelnen Cytokeratinen einzeln zugeordnete Fänger-Antikörper solche Fänger-Antikörper eingesetzt werden, die in Kombination die einzelnen Cytokeratine erkennen. Zum Beispiel die Kombination C-501 und C-504 erkennt das Cytokeratin Nr. X, die Kombination C-501 und C-503 erkennt das Cytokeratin (X + 1).

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Erkennung von Metastasen einer ersten Gewebeklasse, die in einem Wirtsgewebe einer zweiten Gewebeklasse angesiedelt sind, bei dem Intermediärfilamentproteine aus dem Gesamtgewebe mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden, dadurch gekennzeichnet,

daß aus dem Gesamtgewebe ein Homogenat gebildet wird,

daß auf das Homogenat abbauend eingewirkt wird, bis aus wenigstens einem großen Teil der Intermediärfilamentproteine jeweils ein Fragment, welches das alpha-helikale Mittelstück enthält, freigesetzt ist,

daß dann die lösliche Fraktion aufgetrennt wird und,

daß dann die in der löslichen Fraktion enthaltenen alpha-helikalen Mittelstücke in löslicher Phase immunologisch identifiziert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

daß von den Intermediärfilamentproteinen beider Gewebetypen des Homogenats ein vorgegebener Anteil identifiziert und quantifiziert wird, und

daß daraus der Anteil des Metastasengewebes am Wirtsgewebe ermittelt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,

daß bei Cytokeratin die Art des jeweils zugeordneten Epithelgewebes anhand der relativen Anteile der identifizierten Cytokeratine (NR 1 - 19) bestimmt und quantifiziert wird und

daß Cytokeratinanteil relativ zum Vimentinanteil bestimmt wird.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

daß die Intermediärfilamentproteine nur so weit abgebaut werden, bis sie zu 60 bis 100 Gewichtsprozent bei einer Temperatur von 0 - 40 Grad Celsius in Wasser- beziehungsweise Pufferlösungen löslich sind.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

daß die Intermediärfilamentproteine nur so weit abgebaut werden, daß bei einer für die immunologische Bestimmung ausreichenden Menge der Moleküle das alpha-helikale Mittelstück intakt bleibt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Wirtsgewebe Lymphgewebe ist.

7. Verfahren nach Anspruch 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Metastasengewebe ein anderes Organ ist.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

daß der teilweise Abbau der Intermediärfilamentproteine proteolytisch erfolgt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

daß der proteolytische Abbau in kontrollierter Weise gestoppt wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,

daß gleichzeitig der Anteil zweier oder mehrerer IF-Proteine bestimmt wird.